解脂耶氏酵母中囊泡蛋白 YlSec15 的鉴定及功能研究

陈凯丽[1] 张付涛[1] 王东月[1] 张倩[1] 李运清[2*]

（1.济宁医学院临床医学院 2.济宁医学院病原生物学教研室）

摘要：解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）进行出芽繁殖时，决定未来分裂平面的出芽位点不是随机选取的，而是选择在前一次细胞分裂位置的对侧出芽，即进行双极出芽。目前对解脂耶氏酵母双极出芽的分子调控机制并不清楚。本研究通过观察蛋白定位及过量表达的方法研究了解脂耶氏酵母中囊泡蛋白 YlSec15 的功能。结果表明：YlSec15 在细胞中有明显的极性定位，在细胞的小芽内以及大中芽的芽颈处富集，过量表达 YlSec15 抑制了菌丝的形成并使得部分细胞的出芽位点选择方式由双极出芽转变为随机出芽，而引起这一变化的原因可能是由于过量的 YlSec15 在细胞中不能进行正常的极性定位。此外，YlSec15 可能是通过 YlRas2 介导的信号通路参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽。这一发现丰富了解脂耶氏酵母中双极出芽的分子调控机制，也证明了极性生长与囊泡运输之间是相互影响的。

关键词：解脂耶氏酵母；双极出芽；菌丝；囊泡蛋白；YlSec15

Identification and Characterization of the Vesicle Protein YlSec15 in *Yarrowia lipolytica*

CHEN Kai-li[1], ZHANG Fu-tao[1], WANG Dong-yue[1], ZHANG Qian[1], LI Yun-qing[2*]

(1.School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China; 2.Department of Pathogenic Biology, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China.)

Abstract: *Yarrowia lipolytica* is a budding yeast and the budding position which determined the division plane is not selected randomly but determined by the distance of the last division site, that is, bud in the bipolar budding pattern. At present, the molecular regulation pathway of the bipolar budding is not well studied. In this report, the characterization of the vesicle protein YlSec15 was studied through the localization and overexpression. YlSec15 can locate inside the small buds and the neck of the middle or big buds, indicating the patterns of polar localization. Overexpression of YlSec15 in the yeast can inhibit the formation of hyphae and change budding pattern of cells, from bipolar to random. The causes of these changes may be

基金项目：国家自然科学基金青年基金（No. 31500056）

*通讯作者，电子信箱：E-mail: liyunqing2013@whu.edu.cn

due to the delocalization to the polar site of the excessive YlSec15. Besides, the normal localization of YlSec15 dependent on Ylras2. Based on this result, we speculate that YlSec15 may be involved in regulating the polar growth of cells through the signal pathway which is mediated by YlRas2. The discovery in this paper will enrich the molecular regulation mechanism of the bipolar budding and confirm the relationship between polar growth and vesicle transport in *Yarrowia lipolytica*.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; bipolar budding; hyphae; vesicle protein; YlSec15

酵母以出芽的方式进行繁殖，当细胞的出芽位点确定以后，细胞开始进行芽体的生长，芽体的生长涉及到细胞内细胞骨架的极性分布、囊泡运输以及细胞膜的融合和重构[1]。出芽位点的选择以及芽体的长大都是一个高度极性化的过程，该过程中细胞极性的建立和维持受到时间和空间的严格调控[2]。目前对细胞出芽位点选择的分子调控机制主要集中在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）这一模式生物中，并且形成了一个初步完整的分子信号通路，但在其它一些非常规酵母中对出芽位点选择的分子调控机制的研究开展的很少[3]。因此我们非常感兴趣的一个问题是酿酒酵母中的出芽位点选择的分子调控机制是否具有普遍意义。

解脂耶氏酵母是一种非常规酵母，该酵母在进化程度上与酿酒酵母相距较远，因其独特的生理生化和新陈代谢方式逐渐引起了广大研究者的兴趣[4]。解脂耶氏酵母以双极出芽的方式进行出芽位点的选择，所谓双极出芽是指子细胞选择在上次出芽位点的对侧组装新的芽体，母细胞在上次出芽位点的对侧或者临侧组装新的芽体，细胞表面的芽痕分布在细胞的两极。在解脂耶氏酵母中双极出芽是一种非常稳定的出芽位点选择方式，它不随着细胞的类型、细胞的生长环境等改变而发生改变，这与酿酒酵母和白色念珠菌均不相同[5-7]。因此我们对其分子调控通路非常感兴趣，希望找到这种稳定的双极出芽的分子调控通路。

前期的研究结果表明在解脂耶氏酵母中可能存在两条独立的信号通路参与调控细胞的双极出芽，分别是 YlRsr1 和 YlRas2 介导的。其中 YlRsr1 介导的信号通路与酿酒酵母中双极出芽调控的信号通路是一致的，通过 YlRsr1→YlCdc24→YlCdc42 发挥作用。YlRas2 介导的信号通路可能是与细胞的极性生长密切相关，但该通路中的其它成员目前还没有被发现[8-9]。在细胞的极性生长过程中囊泡转运是一个高度极性化的过程，它包括囊泡的发生、运输、聚集以及细胞膜融合几个过程，在这个过程中 exocyst 复合物

发挥着非常重要的作用。Exocyst 复合物是进化上保守的八蛋白复合物，由 Sec3、Sec5、Sec6、Sec85、Sec10、Sec15、Exo70、Exo84 共同组成，在囊泡转运过程中具有高度的动态性[10]。那么双极出芽和囊泡转运这两个高度极性化的过程之间有没有一定的联系，囊泡蛋白是否参与对细胞双极出芽的调控？

Guo 等人发现在白色念珠菌（*Candida albicans*）中 Sec15 除了参与细胞的囊泡转运外，还参与了细胞的极性生长及出芽位点选择的调控。*SEC15* 缺失后细胞不能形成菌丝，出芽位点选择方式由轴向出芽转变为随机出芽。他们还检测到 YlSec15 在细胞中的正常定位是由 Rsr1 和 Bem1 介导的，而 Rsr1 和 Bem1 都参与了对细胞出芽位点选择的调控[11]。这表明在白色念珠菌中囊泡蛋白是参与到细胞的菌丝形成及出芽位点选择的调控中的，那么在解脂耶氏酵母中是否存在类似的情况呢？

在解脂耶氏酵母中，YlRsr1 和 YlBem1 同样参与了对细胞出芽位点选择的调控，缺失或突变后细胞的出芽位点选择方式由双极出芽转变为随机出芽[8, 12]。因此我们感兴趣的是在解脂耶氏酵母中是否存在囊泡蛋白 Sec15，如果存在该蛋白是否参与调控细胞的双极出芽。本研究中我们找到了解脂耶氏酵母中的 YlSec15，分析发现该蛋白在细胞中有明显的极性定位，可以定位在细胞的小芽中及大中芽的芽颈处；该蛋白参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽，并且可能与 YlRas2 相互作用。本研究帮助我们进一步理解出芽位点选择和囊泡运输这两个高度极性化过程之间的联系，进一步完善了解脂耶氏酵母中双极出芽的调控通路。

1 材料与方法

1.1 菌株和引物

实验中所用菌株如表 1 所示

表 1 实验中所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株	基因型	来源
PO1a	*MATA leu2-270 ura3-302*	13
YLX260	*MATA leu2-270 ura3-302* Yl*rsr1Δ::loxR/P*	8
YLX81	*MATA leu2-270 ura3-302* Yl*ras2*	9
YLJ4	*MATA leu2-270 ura3-302* [*Integrative URA3* YlSec15↑]	This study
YLJ8	*MATA leu2-270 ura3-302* [*CEN LEU2* Yl*SEC15-EGFP*]	This study

YLJ9	*MATA leu2-270 ura3-302* [*CEN LEU2 EGFP*-YlSec15↑]	This study
DH5α	F^- *endA*1 *glnV*44 *thi*-1 *recA*1 *relA*1 *gyrA*96 *deoR nupG* Φ80d*lacZ*ΔM15Δ (*lacZYA-argF*) U169, *hsdR*17 (r_K^- m_K^+), λ–	Takara, Japan

实验中所用引物如表 2 所示：

表 2 实验中所用的主要引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列（5’→3’）
Y1SEC15-1F	GGAAGATCTTGCACATCTGAAACTTCTCAAC
Y1SEC15-1R	CGCGGATCCAGGCTCATGTGCACCAGACGC
Y1SEC15-3F	CGCGGATCCATGAAGATCCCCAATGTCTCC
Y1SEC15-3R	CCGGAATTCCCACGGATCTGATCACTGGAGT
Y1SEC15-TR	ACCCATCGATATTGATCTTGAGCAGACCGTCAC

1.2 培养基的配置

基本培养基 YPD 培养基：20 g 蛋白胨，10 g 酵母提取物，20 g 葡萄糖，加入 1000 ml 的去离子水；合成培养基 YNBD 培养基：6.7 g/L 酵母氮碱，20 g/L 葡萄糖，根据需要补加 0.08 g/L 亮氨酸或 0.02 g/L 尿嘧啶；促进菌丝形成的 YNDC7 培养基：6.7 g/L 酵母氮碱，20 g/L 葡萄糖，加入柠檬酸和柠檬酸钠调节 pH 值至 7.0，根据需要补加 0.08 g/L 亮氨酸或 0.02 g/L 尿嘧啶。培养大肠杆菌的 LB 培养基：10g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，10 g/L NaCl，（调 pH 至 7.2 -7.4），LA 培养基在 LB 的基础上加入 100 µg/ml 氨苄青霉素。如若配固体培养基则加入琼脂至终浓度 2%。

1.3 酵母菌的培养及形态观察

YPD 固体培养基：将菌株划线至 YPD 固体培养基中，置于 30℃培养箱中培养 3 d，观察菌株的菌落形态，然后置于低倍显微镜下（10*10）观察菌落的显微结构。

YNBD 固体培养基：将新鲜的待观察菌株划线至 YNBD 固体培养基，置于 30℃培养箱中培养 15 h 后，挑取少量新鲜菌苔在荧光显微镜下观察融合蛋白在细胞中的定位。

YPD 液体培养基：将新鲜的待观察菌株接种至 3 ml YPD 液体培养基中，30℃震荡培养 12 h 后于高倍显微镜下（10*100）观察细胞的形态。

YNDC7 培养基：将新鲜的待观察菌株接种至 3 ml YNDC7 液体培养基中，30℃震荡培养 20 h 后于高倍显微镜下（10*100）观察细胞的形态。

用于观察细胞形态及荧光的显微镜型号为奥林巴斯 BX51，采用 DP80 摄像机及 QCapture 系统采集图片。

1.4 芽痕快速染色及出芽位点选择方式的统计方法

挑取新鲜的酵母单菌落接种于 3 ml 的 YPD 液体培养基中，30℃震荡培养 12 h 后收集菌体。用 1 ml 的 ddH_2O 清洗细胞两次，将菌体溶于适量的 ddH_2O 中制成菌悬液，加入 5 μl 的 0.01% Calcofluor white 染液。取 2 μl 菌悬液滴在载玻片上，盖上盖玻片并用力按压，注意用力均匀把细胞压扁并防止盖玻片被压碎，在紫外荧光下观察细胞表面的芽痕分布。

将细胞表面平均分成三个部分：两极及中间部分。如果细胞表面的芽痕均分布在细胞的两极，则为双极出芽；如果细胞表面的芽痕随机的分布在细胞的表面，则为随机出芽，每次至少统计 200 个细胞然后计算各种出芽位点选择方式所占的比例。

1.5 质粒的构建

以野生型菌株 PO1a 的基因组为模板，YlSec15-1F&YlSec15-1R 为引物将含有 1103 bp 的启动子以及整个 ORF（Open read fragment，开放阅读框）的 YlSec15 片段扩增下来，用 *Bgl*II&*Bam*HI 酶切后连接到这两个酶酶切后的质粒 pYL14[14]中，构成质粒 pYL14-YlSEC15， GFP 融合在 YlSec15 的 C 端。构建好的质粒直接转入到解脂耶氏酵母野生型菌株中用于观察 YlSec15-EGFP 融合蛋白在细胞中的定位。

以野生型菌株 PO1a 的基因组为模板，以 YlSec15-3F&YlSec15-TR 为引物将含有 YlSec15 的 ORF 以及 1022 bp 终止序列的 YlSec15 片段扩增下来，用 *Bam*HI&*Cla*I 酶切后连接到质粒 pYL15（*Bam*HI&*Cla*I）中，构成质粒 pYL15-YlSEC15 ，GFP 融合在 YlSec15 的 N 端， Yl*TEF1* 的强启动子启动融合蛋白的表达。构建好的质粒直接转入到解脂耶氏酵母野生型菌株中用于观察过量表达的 EGFP-YlSec15 融合蛋白在细胞中的定位。

以野生型菌株 PO1a 的基因组为模板，以 YlSec15-3F&YlSec15-3R 为引物将含有 YlSec15 的 ORF 以及 550 bp 终止序列的 YlSec15 片段扩增下来，用 *Bam*HI&*Eco*RI 酶切后连接到质粒 pYL4（*Bam*HI&*Eco*RI）中，构成质粒 pYL4-YlSEC15，Yl*TEF1* 的强启动子启动 YlSec15 的表达。构建好的质粒用 *Eco*RI 单酶切后转入野生型酵母中，至少挑取三个独立的转化子观察细胞的形态，用于评估过量表达 YlSec15 后对细胞形态的影响。

1.6 酵母的转化

解脂耶氏酵母的快速转化方法参照参考文献[14]。

2 结果讨论

2.1 YlSec15 的鉴定及结构分析

在白色念珠菌中，Sec15 除了参与调控细胞的囊泡转运以外，还参与了细胞的极性生长及出芽位点选择调控。*SEC15* 缺失后细胞不能形成菌丝，并且出芽位点选择方式由轴向出芽转变为随机出芽[12]。因此我们想知道在解脂耶氏酵母中是否存在 Sec15 的同源蛋白，如果存在，该蛋白是否参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽。我们用白色念珠菌及酿酒酵母中的 Sec15 的氨基酸序列在解脂耶氏酵母的数据库中进行序列比对，试图找到与之同源性较高的蛋白。我们发现蛋白 YALI0F12969p 与这两个 Sec15 的同源性都比较高，分别为 35%和 39%。该蛋白含有 829 个氨基酸，对它们的保守结构域分析发现，这三个蛋白有相同的保守结构域——Sec15 超家族结构域（图 1 (a)），该结构域属于此类蛋白的标志性结构域，参与囊泡与细胞膜的融合[10]。且 YALI0F12969 的 Sec15 超家族结构域与白色念珠菌和酿酒酵母中的 Sec15 超家族结构域的同源性较高，分别为 44%和 47%（图 1 (b)）。综上，我们将该蛋白命名为 YlSec15 并对其功能进行研究。

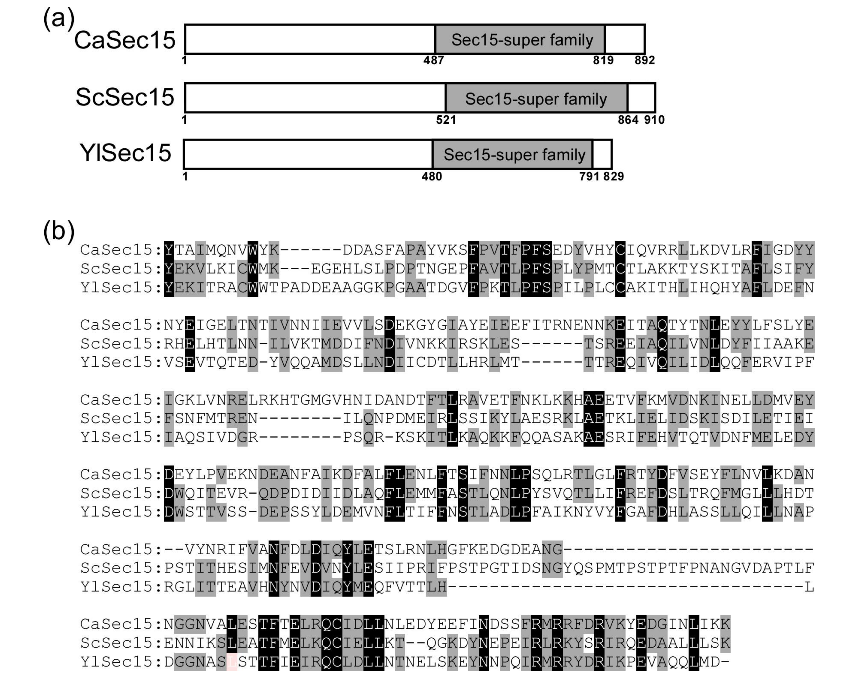


图 1 YlSec15 的分离及鉴定

Fig.1 Isolation and identification of YlSec15

(a). Schematic representation of the domain structure of *C. albicans* CaSec15, *S. cerevisiae* ScSec15 and *Y. lipolytica* YlSec15. The conserved Sec15 superfamily domain is marked in gray. (b). Amino acid sequence alignment of Sec15 superfamily domain in CaSec15, ScSec15, and YlSec15. Identical and similar residues are highlighted in black and gray, respectively.

2.2 YlSec15-EGFP 融合蛋白在细胞中的定位

蛋白质在细胞中的定位模式与其功能是直接相关的，因此我们构建了 YlSec15-EGFP 的融合蛋白，将荧光蛋白 EGFP 融合在 YlSec15 的 C 短，观察该融合蛋白在细胞中的分布情况。我们发现 YlSec15-EGFP 在细胞中有明显的极性定位。在细胞刚刚萌发出小芽体时，YlSec15 在小芽体中富集，而在母细胞中并没有发现该融合蛋白的分布。随着芽体的长大，该定位消失，YlSec15-EGFP 在细胞中没有明显的定位，弥散的分布在细胞质中。随着芽体的长大，该融合蛋白分布在细胞的芽颈处，直至细胞分开（图 2）。YlSec15-EGFP 的这种极性定位模式与酿酒酵母和白色念珠菌中 Sec15 的定位方式基本一致[13,15]，这提示我们这三个蛋白在功能上可能也存在相似性。该蛋白可能参与调控了细胞的极性生长，尤其是它可以定位在细胞的芽颈处暗示我们 YlSec15 可能参与调控细胞的出芽位点选择。为了验证这一猜测，我们对解脂耶氏酵母中 YlSec15 的功能进行了研究。

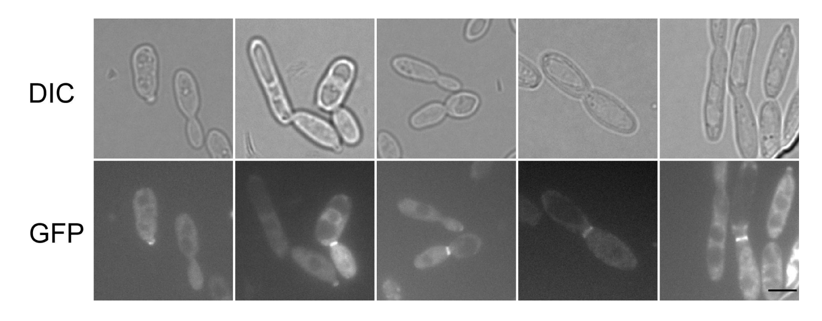


图 2 YlSec15-EGFP 在细胞中的定位

Fig.2 Localization of YlSec15-EGFP in cells

Cells of wild type strain PO1a carrying plasmid pYL14-YlSec15 were grown in solid YNBD +Ura medium at 30 °C for 16 hours, then GFP fluorescence was observed under the oil microscope. Bar, 5 μm.

2.3 过量表达 YlSec15 影响细胞的菌丝形成

在酿酒酵母中，Sec15 缺失后细胞不能存活，并有证据表明 Sec15 可以与 Bem1 相互作用参与指导细胞的极性生长[16]。在白色念珠菌中，Sec15 缺失后细胞仍可以存活，但细胞生长变慢而且极性生长存在缺陷，表现为细胞不能形成菌丝[12]。我们试图通过同源重组的方法对 YlSec15 进行敲除，但经过多次尝试后都没有得到 YlSec15 被正确敲除的菌株，因此我们猜测在解脂耶氏酵母中 YlSec15 缺失后可能是致死的，故而我们得不到正确的缺失突变体，这一结论有待进一步的实验去证明。

为了研究 YlSec15 在细胞中的功能，我们用高表达的启动子 Yl*TEF1* 启动 YlSec15

的表达，观察该蛋白过量表达后对细胞的生长及形态是否有影响。在 YPD 固体平板上，过量表达 YlSec15 并不影响细胞的生长速度，所形成的菌落大小与野生型菌株一致。但是菌落形态存在一定的差异，野生型 PO1a 在固体 YPD 平板上培养 3 天后形成四周隆起，中间凹陷，边缘毛绒状的菌落，而过量表达 YlSec15 后，菌落表面光滑，中间隆起，边缘整齐（图 3 (a)）。在低倍显微镜下观察菌落边缘发现野生型 PO1a 的菌落边缘有细胞形成的假菌丝向外延伸，而过量表达 YlSec15 后，菌落边缘整齐，没有假菌丝伸出（图 3 (b)），这提示我们这两组细胞的形态可能存在差异。

为进一步研究过量表达 YlSec15 对细胞形态的影响，我们观察了液体培养基中这两组细胞的形态。在 YPD 液体培养基中，野生型 PO1a 呈卵圆形生长，而过量表达 YlSec15 后，部分细胞变圆（45%，n=200），且略大，表现为极性轻微丧失的形态。在促进菌丝形成的 YNDC7 液体培养基中，野生型 PO1a 细胞变长形成芽管，部分细胞形成菌丝；而过量表达 YlSec15 后，细胞不能伸长形成芽管或菌丝，只表现出略微的椭圆形（图 3 (c)），这表明过量的 YlSec15 可能影响了细胞的极性生长，细胞表现为菌丝形成缺陷。

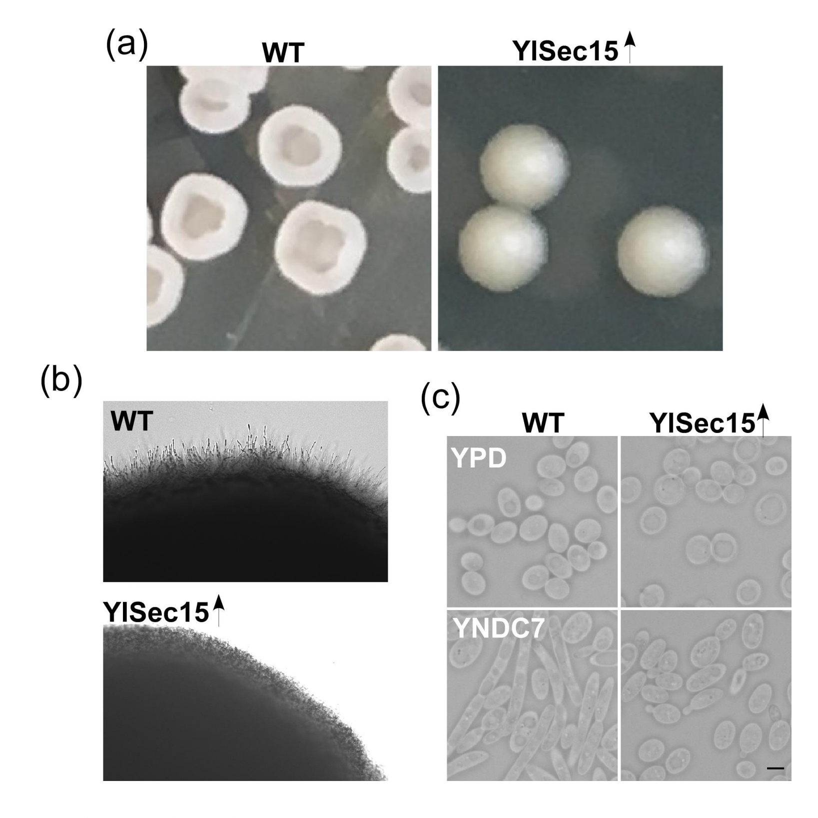


图 3 YlSec15 参与调控细胞的形态

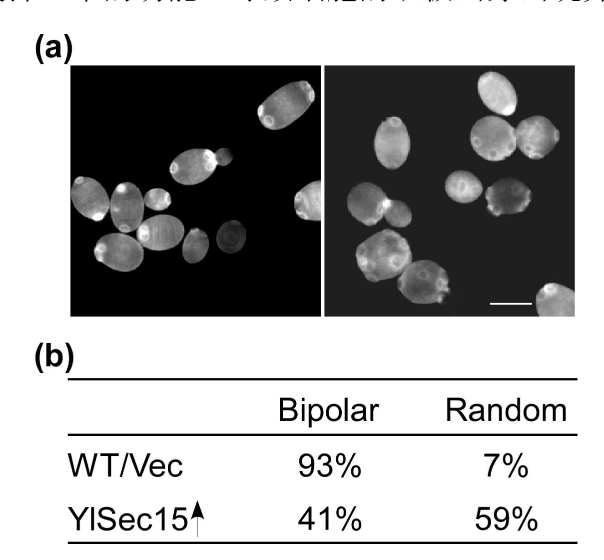
Fig.3 YlSec15 is involved in regulating cell morphology

(a). Cells of strain PO1a with plasmids pYL4 or pYL4-YlSec15 were grown in YPD solid medium at 30 °C for 3 days, then the colonial morphology was examined. (b). Edge of the

colonies in (a) was examined by a low-power microscope with 10*10. (c). Cells as in (a) were incubated in liquid YPD and YNDC7 mediums for 12 hours and 16 hours, respectively. Bar, 5μm.

2.4 过量表达 YlSec15 影响了细胞的双极出芽

在白色念珠菌中，Sec15 缺失后使细胞的出芽位点选择方式由轴向出芽转变为随机出芽[13]，而我们发现在解脂耶氏酵母中过量表达 YlSec15 后也影响了细胞的极性生长，因此我们检测了过量表达 YlSec15 后对细胞双极出芽的影响。我们发现将 YlSec15 过量表达后有部分细胞（59%，n=200）的出芽位点选择方式由双极出芽转变为随机出芽（图 4），只有 41%的细胞可以进行双极出芽；而野生型细胞中有 93%（n=200）的细胞均可以进行双极出芽。综上，在解脂耶氏酵母中 YlSec15 可能参与调控细胞的双极出芽，过量的 YlSec15 不能发挥正常的功能，导致细胞的双极出芽出现异常。



	Bipolar	Random
WT/Vec	93%	7%
YlSec15↑	41%	59%

图 4 过量表达 YlSec15 影响细胞的双极出芽

Fig.4 Overexpression of YlSec15 influence the bipolar budding of cells

(a). Cells of wild type strain PO1a with plasmids pYL4 or pYL4-YlSec15 were grown in solid YPD medium at 30 °C for 12 hours, then stained with Calcofluor white to identify patterns of bud-site selection. (b). Budding patterns of cells in (a), the percentage of bipolar and random budding cells was counted. Bar, 5μm.

2.5 过量表达的 YlSec15 在细胞中极性定位消失

由前面的结果我们看到 YlSec15 过量表达后影响了细胞的菌丝形成及双极出芽，那么引起这一现象的原因是什么呢，过量表达后 YlSec15 在细胞中的定位是否发生了紊乱？我们将 EGFP 连接在 YlSec15 的 N 端，并用高表达的 Yl*TEF1* 启动子启动表达该融

合蛋白的表达。我们发现 Yl*TEF1* 启动的 EGFP-YlSec15 表达量较高，细胞中绿色荧光的亮度有很大提高。但是融合蛋白在细胞中的极性定位丧失，表现为融合蛋白呈颗粒状无序的分布在细胞中。在即将出芽的细胞中，EGFP-YlSec15 呈一个或多个颗粒状分布在细胞质中，当细胞产生小的芽体后，融合蛋白分布在芽体与母细胞的交界处，但未进入到小芽体中；随着芽体长大，EGFP-YlSec15 呈颗粒状分布在芽体中；当芽体进一步增大，EGFP-YlSec15 在母细胞和芽体中均有分布，但比较紊乱，没有特定的某些位点的聚集，芽颈处的定位消失（图 5）。综上，增多的 YlSec15 不能在细胞中进行正常的极性定位，而错误的定位方式导致 YlSec15 不能发挥正常的功能，进而影响了细胞的菌丝形成和双极出芽。

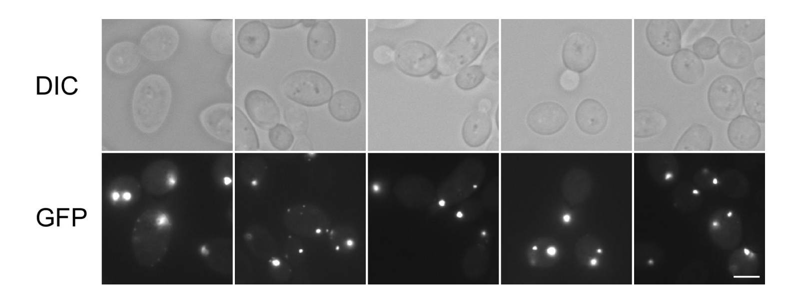


图 5 过量的 YlSec15 在细胞中的分布

Fig.5 Distribution of excess YlSec15 in cells

Cells of wild type strain PO1a with plasmid pYL15-YlSec15 were grown in solid YNBD+Ura medium at 30 °C for 16 hours, then GFP fluorescence was observed. Bar, 5 μm.

2.6 YlSec15 可能通过与 YlRas2 相互作用参与调控细胞的双极出芽及菌丝形成

以上结果表明 YlSec15 参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽，那么该蛋白可能的调控通路是什么呢？目前的研究表明在解脂耶氏酵母中存在两条独立的信号通路参与调控细胞的双极出芽：一是 Rho GTP 酶 YlRsr1 介导的信号通路，二是 Ras 相关蛋白 YlRas2 介导的信号通路，这两条信号通路共同参与调控解脂耶氏酵母的双极出芽[8]，其中 YlRas2 也参与调控细胞的菌丝形成[9]，因此我们想知道 YlSec15 是否通过这两条信号通路参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽。

我们将 YlSec15-EGFP 融合蛋白分别转入 Yl*rsr1*Δ以及 Yl*ras2*Δ缺失菌株中，观察该融合蛋白在细胞中的定位是否正常。我们发现在 Yl*rsr1*Δ缺失菌株中，EGFP-YlSec15 可以正常的定位在小芽的顶端以及大中芽的芽颈处（图 6），这与其在野生型细胞中的定位是一致的；而在 Yl*ras2*Δ缺失菌株中，EGFP-YlSec15 不能在小芽体中富集，在极少量的细胞中仍能定位在大中芽的芽颈处，但该定位较弱（图 6）。以上实验结果表明

在解脂耶氏酵母中 YlSec15 的正常极性定位可能是依赖于 YlRas2 的，这提示我们 YlSec15 可能是通过 YlRas2 这条信号通路参与调控细胞的菌丝形成及双极出芽。这与酿酒酵母和白色念珠菌中是不同的，在这两种酵母中，YlSec15 都与 Rsr1 存在相互作用，通过与 Rsr1 相互作用调控细胞的双极出芽及极性生长过程。在白色念珠菌中，Sec15 在 *rsr1*Δ的菌株中不能正常定位，而在解脂耶氏酵母 Yl*rsr1*Δ菌株中，YlSec15 有正常的极性定位，这表明 YlSec15 可能是通过 YlRas2 介导的信号通路参与调控细胞的极性生长，而不是通过 YlRsr1 介导。这也暗示了在解脂耶氏酵母中，YlRas2 介导的信号通路可能是参与调控双极出芽的主要通路，而 YlRsr1 所在通路的功能是弱化的，这与模式生物酿酒酵母是不同的。

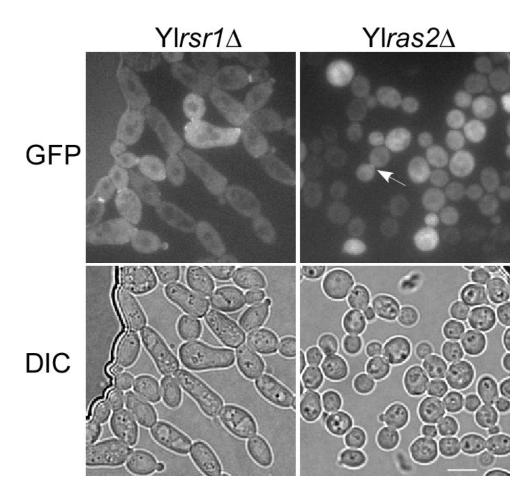


图 6 YlSec15-EGFP 在 Yl*rsr1*Δ和 Yl*ras2*Δ中的定位

Fig.6 Localization of YlSec15-EGFP in Yl*rsr1*Δ and Yl*ras2*Δ strains

Cells of strains Yl*rsr1*Δ or Yl*ras2*Δ with plasmid pYL14-YlSec15 were grown in solid YNBD+Ura medium at 30 °C for 16 hours, then GFP fluorescence was observed. Bar, 5μm.

3 结论

通过过量表达和观察蛋白在细胞中的定位，我们对解脂耶氏酵母中囊泡蛋白 YlSec15 的功能进行研究，结果表明：（1）在解脂耶氏酵母中存在囊泡蛋白 Sec15 的同源蛋白 YlSec15，该蛋白在细胞中的定位方式与酿酒酵母和白色念珠菌中的 Sec15 是一致的，可以聚集在小芽中以及大中芽的芽颈处；（2）过量表达 YlSec15 后该蛋白在细胞中不能进行正常的极性定位，紊乱的分布在细胞质中，进而引起细胞形成菌丝的能力减弱，部分细胞出芽位点选择方式由双极出芽转变为随机出芽，这也表明 YlSec15 的极性定位对其发挥正常的生物学功能有非常重要的作用；（3）YlSec15 可能通过 YlRas2

介导的信号通路参与调控细胞的菌丝形成以及出芽位点的选择，而不是通过 YlRsr1 介导的信号通路完成的。

这一发现进一步丰富了解脂耶氏酵母中双极出芽的分子调控机制，也阐述了极性生长与囊泡运输之间是存在直接关系的。但是本研究仅仅通过过量表达以及观察蛋白在细胞中的定位研究了囊泡蛋白 YlSec15 的功能，具有一定的局限性，更深入的研究有待进一步的开展。

致谢

本研究还受到济宁医学院大学生科研项目（No. JYXS2017KJ005），大学生创新训练计划项目（No. cx2018020），济宁医学院博士启动基金（No. JY2015BS13）以及济宁医学院科研扶持基金（No. JY2017KJ012）的支持，在此一并表示感谢。

参考文献：

[1] Chiou J G, Balasubramanian M K, and Lew D. Cell polarity in yeast. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2017, 33: 77-101.

[2] Howell A S, and Lew D J. Morphogenesis and the cell cycle. Genetics, 2012, 190(1): 51-77.

[3] Park H O, and Bi E. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. Microbiology and Molecular Biology Review, 2007, 71(1): 48-96.

[4] Nicaud J M. *Yarrowia lipolytica.* Yeast, 2012, 29(10): 409-418.

[5] Herrero A B, López M C, Fernández L L, et al. *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. Microbiology, 1999, 145(10): 2727-2737.

[6] Veses V N, and Gow N A. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. Medical Mycology. 2008, 47(3): 268-275.

[7] Cullen P J, and Sprague G F. The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. Molecular Biology of the Cell. 2002, 13(9): 2990-3004.

[8] Li Y Q, Li M, Zhao X F, et al. A role for the Rap GTPase YlRsr1 in cellular morphogenesis and the involvement of YlRsr1 and the Ras GTPase YlRas2 in bud site selection in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica.* Eukaryotic Cell, 2014, 13(5): 580-590.

[9] Li M, Li Y Q, Zhao X F, et al. Roles of the three Ras proteins in the regulation of dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research, 2014, 14 (3): 451-463.

[10] TerBush D R, Maurice T, Roth D, et al. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. The EMBO Journal, 1996, 15(23): 6483-6494.

[11] Guo P P, Yong J Y, Wang Y M, et al. Sec15 links bud site selection to polarised cell growth and exocytosis in *Candida albicans*. Scientific Report, 2016, 6: 26464.

[12] Hurtado C A, and Rachubinski R A. Isolation and characterization of Yl*BEM1*, a gene required for cell polarization and differentiation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica.* Eukaryotic Cell, 2002, 1(4): 526-537.

[13] Richard M, Quijano R R, Bezzate S, et al. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Bacteriology, 2001, 183(10): 3098-3107.

[14] Zhao X F, Li M, Li Y Q, et al. The TEA/ATTS transcription factor YlTec1p represses yeast-to-hypha transition in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research. 2013, 13(1): 50-61.

[15] TerBush D R, and Novick P. Sec6, Sec8, and Secl5 are components of a multi-subunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Cell Biology, 1995, 130(2): 299-312.

[16] France Y E, Boyd C, Coleman J, et al. 2005, The polarity-establishment component Bem1p interacts with the exocyst complex through the Sec15p subunit. Journal of Cell Science, 119(5): 876-888.